

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jany Tomšíčkové, posluchačky Jihočeské univerzity s názvem „Fungicidní aktivita sinic rodu *Nostoc*“

Cílem této disertační práce bylo vyhledávání a identifikace fungicidních látek ze skupiny scytofycinů v biomase a kultivačních médiích sinic rodu *Nostoc punctiforme* Lukešová 5/96 včetně praktických aplikací. Byla testována fungicidní aktivita proti houbovým patogenům a cytotoxicita těchto látek na živočišných buněčných liniích a korýších *Artemia*. Fungicidně působící látky byly následně purifikovány a analyzovány metodou cílených fragmentací a použitím hmotnostního spektrometru byly nalezeny jejich chemické struktury. Tematicky zapadá tato práce do činnosti Laboratoře řasových biotechnologií, kde se skupiny dr. Jiřího Kopeckého a dr. Pavla Hrouzka dlouhodobě zabývají výzkumem bioaktivních látek využitelných ve farmakologii.

Disertace má vcelku dobrou grafickou úpravu, je ucelená a přehledná. Obsahuje asi 80 stran vlastního textu a obsahově je vyvážená. Práce má obvyklé a logické členění na literární úvod, cíle, metodiku, výsledky, diskusi, závěry a seznam literatury; obsahuje také seznam publikovaných prací doktoranda, ale chybí životopis. Úvod (20 stran) je založen na přehledu literatury k tématu, cíle jsou definovány přehledně a jasně v bodech. Metodika práce je zpracována velmi podrobně a pečlivě s přehledem chromatografických technik. Pokusná část práce je přehledná, s dostatečným popisem podmínek a opakování pro kultivační a izolační postupy, což je důležité. Experimentální část obsahuje dostatečné množství výsledků, které jsou logicky uspořádané. Práce obsahuje řadu zajímavých a cenných výsledků, zvláště jsem ocenil růstové pokusy s kulturami za různých podmínek, které indukují syntézu aktivních frakcí toxinů m/z 873, m/z 829 a m/z 875, testování aktivity frakcí toxinů proti houbovým patogenům, včetně rostlinných modelů, a testy cytotoxicity na buněčných liniích a žábrazkách. Diskuse je zpracována dostatečně s přihlédnutím k výsledkům práce a literatuře, včetně doporučení pro masové kultivace. Závěry jsou popsány přehledně a výstižně a odpovídají cílům. V přílohách jsou článek a přijatý rukopis, kde je Mgr. Jana Tomšíčková autorkou nebo spoluautorkou, což splňuje nezbytnou podmínku pro obhajobu dizertace.

Gramatických chyb a překlepů se vyskytuje v textu spíše více než je obvyklé, autorka zřejmě nevěnovala dost času konečné kontrole rukopisu. Případné uveřejnění výsledků v odborném časopise by vyžadovalo zhuštění a úpravu textu. Tady poznamenám, že disertace jsou nyní obvykle psány v angličtině, což bych obecně pro tento typ prací na univerzitách doporučoval. Zjišťuji, že pro studenty je – bohužel – často snadnější psát jednoduchou, ale slušnou angličtinou než dobrou češtinou.

Obecné poznámky a doporučení:

1. Doporučoval bych uvést seznam zkratk na počátku.
2. Při popisu přístrojů v tabulce 1 bych doporučoval uvést jen důležitá zařízení, nikoli běžné laboratorní vybavení jako váhy, pH-metr, aj.; v případě chemikálií uvést všechny s popisem původu s označením na začátku metod, aby se nepopisovaly v textu, atd.
3. Metodickou část práce bych nazval „Materiál a metody“, protože obsahuje i popis mikrořas.
4. Ve všech disertacích je vhodné uvádět krátký životopis na konci práce.
5. Autoreferát práce je velmi krátký (doporučil bych 10 stran textu) a je poněkud „odbylý“.

Věcné a technické poznámky k rukopisu:

1. V češtině se mezi číslem a jednotkou vždy dává mezera, např. %, neuvádí se tečka, $W \cdot m^{-2}$.
2. Popisy se dávají nad vlastní tabulku, u obrázků je to naopak.

3. Při odstředování se udává hodnota přetížení a čas trvání operace, např. $3\ 000 \times g$ po dobu 5 min, otáčky nejsou směrodatné, protože používáme různé typy odstředivek.
4. V textu této práce je často použit laboratorní žargon či zbytečná cizí slova, doporučoval bych věnovat pozornost hezké češtině, když už je práce psána česky. Např. centrifugace = odstředění; cluster – klástr (shluk), scytofycin, epifytický.
5. Doporučoval bych věnovat velkou pozornost stylu jazyka (češtiny), pokud je disertace psána v tomto jazyce, např. u sloves používat také aktiva místo pasiva. V některých částech textu je použito neobratných či těžkopádných formulací, nevhodných českých výrazů či laboratorní žargon (kultura začala sedat, odchytávat frakce, ...) a obsahuje také řadu anglicismů (např. clustry“, píky = vrchol, složka, aj.). Tyto části textu by vyžadovaly „uhlazení“ a autorka tomu měl věnovat větší pozornost.
6. Všechny obrázky a tabulky by měly být samovysvětlující (self-explaining), proto bych vždy doporučoval věnovat pozornost popisům i dostatečně podrobné legendě.

Odborné dotazy pro autora do diskuse:

- Budou ještě některé části práce publikovány?
- Jak byla vlastně stanovena růstová rychlost pro kultury sinic?
- Jaké podmínky byly nevhodnější pro produkci toxinů; z obr. 5 a 6 lze usuzovat něco jiného ($25\ ^\circ\text{C}$, $90\ \text{W m}^{-2}$) než je popsáno na str. 50-51.
- Vysvětlíte nám přehledně, jaký je asi mechanismus interkonverzí jednotlivých forem toxinů $m/z\ 873$, $m/z\ 829$ a $m/z\ 875$ a jejich biologický účinek.

Závěr

Předloženou disertační prací Mgr. Jana Tomšíčková prokázala, že uspokojivě zvládla dané téma z hlediska teoretického i experimentálního. Práce je přínosná pro výzkum bioaktivních látek sinic a z hlediska možných aplikací v biomedicíně. Její kvalita mne, jako oponenta, opravňuje k tomu, abych ji doporučil k obhajobě.

10. listopadu 2013



Doc. RNDr. Jiří Masojídek, CSc.

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Mikrobiologický ústav AVČR v.v.i. v Třeboni

Posudek k předložené disertační práci s názvem „Fungicidní aktivita sinic rodu Nostoc“, kterou vypracovala Mgr. Jana Tomšíčková

Předložená práce, která se zabývá studiem biologicky aktivních látek, vyskytujících se u sinic rodu *Nostoc*, je po formální stránce srozumitelná, členěná do přehledných kapitol, včetně příloh a publikačních výstupů. K jazykové stránce mám drobné výhrady, které nejsou významným měřítkem pro odborné posouzení práce. **Literární přehled** je zpracován do kapitol, které vystihují dosud publikované informace a znalosti ve sledovaném experimentálním záměru. Rovněž kladně hodnotím informační šíři v tomto úvodu, včetně popisu chromatografických metod a postupů čištění žádaných bioaktivních látek. Hlavní pozornost je přitom zaměřena především na nalezení kmenů sinic, vykazující biologickou aktivitu, kterou lze testovat různými přístupy a metodami, které jsou také zde zmíněny a uplatněny ve vlastní experimentální části předložené práce. Přesto bych se chtěla zeptat autorky, zda je možné z dosud publikovaných prací zjistit další screeningové postupy, které by umožnily snadno a rychle nalézt bioaktivní kmen, v tomto případě s fungicidní nebo fungistatickou aktivitou. Rovněž bych se chtěla autorky zeptat, zda také studovala případné biosyntetické dráhy, které by mohly souviset se syntézou toxinů nebo bioaktivních látek v sinicích.

Cílem v této práci je mezi velmi početnou a různorodou skupinou bioaktivních látek produkováných sinicemi nalézt látky vykazující bioaktivní látky s fungicidní aktivitou, jako potenciálním biofungicidem, pravděpodobně s pozitivním environmentálním významem. Pro tento cíl práce byla vybrána experimentální analýza předem vybraného kmene sinic (*Nostoc* Luk. 5/96), u kterého se předpokládala biosyntéza látek s fungicidní aktivitou. Práce je zaměřena na skupinu scyophycinů. Moje otázka zní, lze předpokládat, že studovaný/é kmen/y budou kromě zmíněné skupiny metabolitů syntetizovat i další skupiny bioaktivních látek? Nebo se vždy jedná o jednu skupinu metabolitů, nebo dokonce jeden metabolit, zcela specifické pro sledovaný kmen? A zda tyto metabolity mohou vykazovat i jiné biologické aktivity než fungicidní a jakým způsobem je lze dále ověřovat?

Vlastní experimentální práce byla rozdělena do 7 experimentálních bloků: příprava surových extraktů pro screening kmenů, optimalizace kultivačních podmínek růstu kmenů pro optimalizaci produkce metabolitů, testy na stanovení bioaktivity metabolitů vůči fytopatogenním houbám, vypracování optimálního protokolu pro izolaci sledovaných látek, chromatografická frakcionace extraktů, purifikace pro HPLC metodu s UV detekcí a stanovení chemické struktury funkčních metabolitů.

V kapitole **Materiál a Metody** mne zaujala nepřímá metoda stanovení přírůstku biomasy analýzou úbytků dusičnanových aniontů v kultivačním mediu. Lze touto metodou sledovat i jiné hodnoty než je přírůstek biomasy? Tato metoda byla použita k optimalizaci kultivačního protokolu.

Kapitola Výsledky. Posloupnost testů jak vyplývá z Výsledků, byla zvolena s ohledem na to, jak rychle zjistit bioaktivitu extraktů ze sinic vůči fytopatogenním houbám. Fungicidní testy byly provedeny na izolátech fytopatogenních hub, 65 kmenů sinic nejrůznějšího původu. Proč lze aplikovat jiné než půdní kmeny sinic v tomto screeningu (dostupnost z literatury)? Pro tento screening byl zvolen standardní extrakční postup (kapitola 4.3.).

Otázka zní, je možné, že by optimalizací postupu extrakce (změnou extrakčního činidla dle obrázku č.4) mohlo dojít ke změně této sledované bioaktivity, tzn. že by jiný extrakční postup mohl ukázat i na jiné kmeny než zvolený standardní postup, kde jako organické rozpouštědlo byl použit 100% metanol? Extrakční postupy byly optimalizovány se 100% methanolem a toxinem m/z 873 (metabolit bioaktivního kmene). Jak je možné zajistit stabilitu metabolitů v průběhu extrakčních postupů? Je možné zjistit reálnou výtěžnost metabolitu, tzn. počítá se se ztrátou metabolitu během extrakce? Jedná se o náročný proces, jak velké změny lze očekávat během poměrně jednoduché extrakční metody? Průměrná maximální výtěžnost 0.5 mg/kg byla vztažena na lyofilizovanou biomasu sinice kmene, jehož produkční optimum ve vztahu ke sledovanému metabolitu byla v průměru 0.6 g/l? Je možné, že (maximální) produkce metabolitu se dá ovlivnit v kultivačním protokolu i změnou nefyzikálních veličin (obr. 5 – 9.). Tento optimalizační krok by realizován nejdříve až po screeningu a optimalizaci extrakce? Pokud byly toxiny kumulovány v buněčné kultuře během kultivace při vysoké teplotě pravděpodobně docházelo k autotoxicitě buněk. Je možné, že dojde k podobnému jevu v extrémních přírodních podmínkách (vysoké teploty, nízké obsahy živin v chudých půdách), pokud by se jednalo například o praktické aplikace v zemědělství třetího světa, dokázala by jste to odhanout? Pokud se jednalo o optimalizace živin v médiu docházelo pravděpodobně k disproporcím mezi jednotlivými produkčními maximy jednotlivých metabolitů (m/z 873, 875, 829), lze říci že fyzikální veličiny lze považovat za nejvýznamnější (rozhodující) pro produkci těchto metabolitů?

Testování biologické aktivity. Na základě chromatografických dat analytu surového extraktu testovaného kmene sinice, u tohoto kmene došlo k separaci na 4 hlavní frakce, které byly dále analyzovány vzhledem k jejich fungicidní aktivitě. Pokud se jedná o metabolity jedné biosyntetické dráhy, autorka to pouze předpokládá, určitý meziproductní metabolit (odpovídá frakci) má pravděpodobně nulovou nebo velmi zmenšenou fungicidní aktivitu vzhledem ke konečnému biologickému účinku. Testované fytopatogenní houby (14) vykazovaly rozdílnou citlivost k testovaným frakcím, účinnost je tedy pravděpodobně rovněž vysoce specifická, pravděpodobně i dle specifity vlastních patogenů (kořenové a druhově specifické). Jak byly měřeny inhibiční zóny? Autorka předpokládá nejvýznamnější účinnost inhibice u směsného vzorku oproti jednotlivým frakcím. Vzhledem k tomu, že autorka uvažovala o jiných než pouze o fungistatické nebo fungicidní vlastnosti směsného vzorku extraktu, byly dále provedeny testy fytotoxicity a cytotoxicity. Pravděpodobně se jedná o standardní testy. Při aplikaci extrakce metanolem byl použit 70% roztok v případě hydroponického testu s rostlinou *Chlorophytum* (Zeleneček), kdy byl sledován transport toxinů z roztoku, kořeny do listů. U testu se silně infikovaným osivem máku a lnu se ukazuje inhibice rozvoje plísní, ale zároveň inhibice klíčících rostlinek. Jako kontrola zde bylo infikované osivo bez aplikace extraktu. Jaké lze očekávat výsledky, pokud osivo nebude promořeno plísněmi? Jak si vysvětluje autorka specifitu účinnosti extraktu (3. frakce) na klíčence v případě lnu a máku? Cytotoxicita, jev který platí u žábřonožek (100% mortalita) nebo se jedná o obecnou vlastnost testovaného kmene rovněž pro houby a rostlinné buňky, zejména když toxiny kmene negativně působí na cytoskelet (degradace aktinových jader)? Dá se vyloučit u těchto testů autofytotoxický účinek nebo jsou toxiny produkovány například jen v přítomnosti jiných organismů? V tabulce 13. jsou uvedeny výsledky testu fytotoxicity u různých druhů sinic. Je možné, že místo a původ izolátu může mít význam v tomto testování, tj. budou planktonní izoláty kmenů více toxické než například půdní izoláty, v případě sledovaného kmene izolace realizovaná v půdní jámě po těžbě hnědého uhlí? Je možné nalézt nějaké souvislosti, zejména v případě nalezení aktivního kmene izolovaného z půdy a jeho

fungicidním působení ? V této práci je pravděpodobně vyloučena role fylogenetické příbuznosti kmenů na tvorbu specifity toxinů. Chromatografické analýzy extraktu kmene ukázaly strukturální podobnost toxinů s scytophyciny, bylo stanoveno 8 metabolitů, včetně fragmentů nejsilnějšího tolytoxinu, představující strukturální modifikace základního makrolidického skeletu různými postranními řetězci (tabulky 14, 15).

Kapitola Diskuse. Jak si vysvětluje autorka disproporci mezi růstovým a produkčním maximem ? Mohlo by se jednat o stresové (světelné nebo teplotní) kultivační podmínky, které vyvolávají zvýšenou produkci toxinů, ačkoliv zmiňujete, že se přikláníte k názoru, že optimální růstové podmínky zaručují optimální produkci scytophycinů ? Exudace toxinů do media je pravděpodobně vyloučena. Klíčový metabolit je u sledovaného kmene tolytoxin, je to toxin zajímavý z praktického hlediska ? Autorka zvažuje možnost, že ostatní metabolity nejsou pravděpodobně vázány na biosyntézu tohoto metabolitu a jejich účinnost bude pravděpodobně nižší. Mohla by jste to blíže vysvětlit ? Existují nějaké údaje o biosyntetických drahách scytophycinů, například ve spojení s aktivací specifických genů pro tuto biosyntetickou dráhu? Při sledování fungicidní aktivity kmene autorka připisuje fungicidní účinek především díky biosyntéze tolytoxinu a scytophycinu B, oba metabolity jsou velmi významné cytotoxiny, ačkoliv není dosud objasněna specifita účinku na testované fytopatogenní houby. Plánuje autorka v budoucnosti se zabývat touto problematikou ? U hydroponního testu s rostlinou *Chlorophytum* nedošlo k růstové inhibici, je možné že zde hrála roli i nerozpustnost toxinů ve vodném prostředí ? Jak lze dále velmi rozdílné účinky extraktu na semena lnu a máku jinak vysvětlit než specifitou rostlinného druhu ? Testování na savčích buněčných liniích i na žábřonkách jasně demonstrují cytotoxický účinek kmene, je možné dále využít tento kmen k nějakým jiným účelům ? Pokud je stanoveno, že tolytoxin je „nejsilnější“ toxin, bude se v budoucnosti autorka nebo pracoviště zabývat dalšími metabolity sinic nebo mikrořas, které mají ve své struktuře rovněž přítomný laktonový kruh ? Bude se pravděpodobně jednat o strukturně velmi různorodé metabolity. Je možné předpokládat nalezení dalších metabolitů s fungicidním nebo fungistatickým účinkem, které by nevykazovaly fyto toxické nebo cytotoxické účinky, například analýzou druhého bioaktivního kmene (*Cylindrospermum* C24) s fungicidními účinky ? Purifikace a frakcionace hrubých extraktů je nejnáročnější část analýz, které byly v této práci předloženy. Literatura je velmi dobře zpracovaná a autorka čerpala z velkého množství literárních pramenů. V této práci oceňuji 2 publikační výstupy, které obohacují experimentální data prezentovaná vlastní experimentální činností popsané v kapitole 5. Výsledky.

Závěrem posuzované disertační práce bych ráda ocenila přímý a jasný cíl, možná v budoucnosti s praktickým výstupem. Práce je komplexní, využívá jak biologického tak chemického přístupu řešení. Tato experimentální práce i její vedení vycházejí z dobrých a jasných metodických přístupů, které bych chtěla vyzvednout. Doporučuji předloženou práci k obhajobě.

Posudek vypracovala Ing. Iva Smýkalová, Ph.D.

